

(19)



URZĄD
PATENTOWY
RZECZYPOSPOLITEJ
POLSKIEJ

(10) **PL 247236 B1**

(12)

Opis patentowy

(21) Numer zgłoszenia: **440964**

(22) Data zgłoszenia: **2022.04.15**

(43) Data publikacji o zgłoszeniu: **2023.10.16 BUP 42/2023**

(45) Data publikacji o udzieleniu patentu: **2025.06.02 WUP 22/2025**

(51) MKP:

C07J 13/00 (2006.01)

C07J 75/00 (2006.01)

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIwersytet Przyrodniczy we
Wrocławiu, Wrocław, PL**

(72) Twórca(-y) wynalazku:

**ANNA CHOJNACKA, Wrocław, PL
WITOLD GŁADKOWSKI, Wrocław, PL
ALEKSANDRA GRUDNIEWSKA, Wrocław, PL
ALEKSANDRA WŁOCH, Wrocław, PL
HANNA PRUCHNIK, Strzeszów, PL
MAGDALENA RUDZIŃSKA, Poznań, PL
ANNA GRYGIER, Poznań, PL**

(74) Pełnomocnik:

rzecz. pat. Anna Kasperowicz, Wrocław, PL

(54) Tytuł:

Acyloglicerol zawierający resztę stigmasterolu oraz sposób otrzymywania acyloglicerolu

PL 247236 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest acyloglicerol zawierający resztę stigmasterolu w pozycji sn-3.

Przedmiotem wynalazku jest także sposób otrzymywania acyloglicerolu zawierającego resztę stigmasterolu w pozycji sn-3.

Acyloglicerole zawierające resztę stigmasterolu w pozycji sn-3 mogą stanowić składnik nowych formułacji liposomowych o potencjalnym prozdrowotnym zastosowaniu jako funkcjonalne dodatki do żywności lub nutraceutyki. Acyloglicerole ze względu na naturalną obecność w organizmie ludzkim stanowią również doskonałą bazę do wykorzystania ich jako efektywny lipidowy system dostarczania leków, w tym przypadku dodatkowo wzbogacony o stigmasterol.

Należący do fitosteroli stigmasterol znany jest ze swej aktywności antyhipercholesterolemicznej, przeciwzapalnej, przeciwmiażdżycowej, antyoksydacyjnej (Salehi B., Quispe C., Sharifi-Rad J., Cruz-Martins N., Nigam M., Mishra A.P., Alexeevich Konovalov D., Orobinskaya V., Abu-Reidah I.M., Zam W., Sharopov F., Venneri T., Capasso R., Kukula-Koch W., Wawruszak A., Koch W. Phytosterols: from clinical prevalence to potential clinical applications, *Frontiers in Pharmacology*, 2021, 11, nr 599959). Znane są także pochodne stigmasterolu w postaci estrów z kwasami tłuszczowymi o aktywności antyhipercholesterolemicznej (Moreau R.A., Nyström L., Whitaker B.D., Winkler-Moser J.K., Baer D.J., Gebauer S.K., Flicks K.B. Phytosterols and their derivatives: Structural diversity, distribution, metabolism, analysis, and health-promoting uses, *Progress in Lipid Research*, 2018, 70, 35–61). Uzyskano również pochodną glicerofosfocholiny, w której reszty stigmasterolu są przyłączone poprzez linker bursztynowy jednocześnie w pozycjach sn-1 i sn-2. Utworzone z udziałem tego koniugatu liposomy wykorzystano jako nośniki biologicznie aktywnych związków: doksorubicyny i amfoterycyny B. (Huang Z., Jaafari M.R., Szoka Jr F.C. Disterylphospholipids: nonexchangeable lipids and their application to liposomal drug delivery, *Angewandte Chemie International Edition*, 2009, 48, 4146–4149; Iman M., Huang Z., Szoka Jr F.C., Jaafari M.R. Characterization of the colloidal properties, in vitro antifungal activity, antileishmanial activity and toxicity in mice of a distigmasterylhemisuccinoyl-glycero-phosphocholine liposome-intercalated amphotericin B, *International Journal of Pharmaceutics*, 2011, 408, 163–172).

Znane są także asymetryczne acyloglicerole z przyłączonymi resztami stigmasterolu poprzez linker bursztynowy lub węglanowy jednocześnie w pozycjach sn-1 i sn-2 oraz w pozycjach sn-2 i sn-3 (Rudzińska M., Grudniewska A., Chojnacka A., Gładkowski W., Maciejewska G., Olejnik A., Kowalska K. Distigmasterol-modified acylglycerols as new structured lipids-synthesis, identification and cytotoxicity, *Molecules*, 2021, 26, 6837).

Istotą wynalazku jest acyloglicerol zawierający identyczne reszty kwasów tłuszczowych w pozycjach sn-1 i sn-2 oraz resztę stigmasterolu przyłączoną w pozycji sn-3 poprzez linker bursztynowy.

Wynalazek dotyczy także sposobu otrzymywania acyloglicerolu zawierającego identyczne reszty kwasów tłuszczowych w pozycjach sn-1 i sn-2 oraz resztę stigmasterolu przyłączoną w pozycji sn-3 poprzez linker bursztynowy. Istota wynalazku polega na tym, że z komercyjnie dostępnego lub otrzymanego znanymi metodami literaturowymi (S)-solketalu w sekwencjach trzech następujących kolejno reakcji prowadzonych w bezwodnych rozpuszczalnikach: estryfikacji hemibursztynianem stigmasterylu w obecności czynnika sprzęgającego charakterystycznego dla reakcji estryfikacji oraz pirydyny albo pochodnej pirydyny, hydrolizie połączenia acetalowego w obecności katalizatora i następnie estryfikacji uwolnionych grup hydroksylowych kwasem tłuszczowym, w obecności czynnika sprzęgającego charakterystycznego dla reakcji estryfikacji oraz pirydyny albo pochodnej pirydyny. W wyniku tych przejść chemicznych otrzymuje się acyloglicerol, który oczyszcza się metodami chromatograficznymi.

Korzystnie jest także, gdy reakcje estryfikacji prowadzi się w bezwodnym chloroformie, w obecności dimetyloaminopirydyny a jako odczynnik sprzęgający stosuje się N,N'-dicykloheksylokarbodiimid.

Korzystnie jest, gdy jako katalizator w procesie hydrolizy stosuje się kwas trifluorometanosulfonowy, a reakcję prowadzi się w obniżonej temperaturze, stosując jako rozpuszczalnik mieszaninę trifluoroetanolu i bezwodnego dichlorometanu.

Korzystnie jest, gdy w ostatnim etapie syntezy w reakcji estryfikacji jako kwas tłuszczowy stosuje się kwas palmitynowy lub oleinowy.

Korzystnie jest także, gdy do oczyszczania produktów poszczególnych reakcji stosuje się zautomatyzowany system do chromatografii flash.

Zasadniczą zaletą wynalazku jest otrzymanie asymetrycznego acyloglicerolu zawierającego identyczne reszty kwasów tłuszczowych w pozycjach sn-1 i sn-2 oraz resztę stigmasterolu przyłączoną poprzez linker bursztynowy w pozycji sn-3 z dobrymi wydajnościami. Zaletą wynalazku jest również

otrzymanie produktu w łagodnych warunkach, to jest temperaturze pokojowej lub obniżonej do -12°C i przy ciśnieniu atmosferycznym. Zaletą wynalazku jest też skrócenie procedury izolowania i oczyszczania produktów reakcji z mieszaniny poreakcyjnej dzięki zastosowaniu zautomatyzowanego systemu do chromatografii flash.

Wynalazek jest bliżej objaśniony w przykładach wykonania oraz na figurach rysunku, gdzie fig. 1 przedstawia wykres zmiany płynności błony w różnych temperaturach $[T^{\circ}]$ określonych na podstawie anizotropii A fluorescencji sondy DPH dla kontroli (liposomy uformowane z DPPC) oraz dla trzech mieszanin DPPC i acyloglicerolu otrzymanego zgodnie z przykładem 1, gdzie R stanowi resztę kwasu palmitynowego, w różnych stosunkach molowych DPPC do acyloglicerolu, zaś fig. 2 to wykres zmiany płynności błony w różnych temperaturach $T[^{\circ}]$, określonych na podstawie anizotropii A fluorescencji sondy DPH dla kontroli (liposomy uformowane z DPPC) oraz dla trzech mieszanin DPPC i acyloglicerolu otrzymanego zgodnie z przykładem 2, gdzie R stanowi resztę kwasu oleinowego, w różnych stosunkach molowych DPPC do acyloglicerolu.

Przykład 1: W kolbie dwuszyjnej o pojemności 250 cm^3 umieszcza się $0,4\text{ g}$ (3 mmol) (S)-solketalu, $0,402\text{ g}$ ($3,3\text{ mmol}$) dimetyloaminopirydyny (DMAP) i $0,68\text{ g}$ ($3,3\text{ mmol}$) N,N'-dicykloheksylokarbodiimidu (DCC) w 25 cm^3 bezwodnego chloroformu, a następnie wkrapla 10 cm^3 chloroformowego roztworu zawierającego $1,7\text{ g}$ ($3,3\text{ mmol}$) hemibursztynianu stigmasterylu. Całość umieszcza się na mieszadle magnetycznym i miesza w temperaturze pokojowej. W trakcie reakcji dochodzi do estryfikacji grupy hydroksylowej (S)-solketalu hemibursztynianem stigmasterylu. Po 24 godzinach powstały biały osad usuwa się z mieszaniny poreakcyjnej poprzez odsączenie pod zmniejszonym ciśnieniem z użyciem lejka ze spiekem o porowatości G4 a przesącz przemywa się kolejno $0,5$ molowym roztworem kwasu solnego oraz nasyconym roztworem chlorku sodu do odczynu obojętnego. Warstwę organiczną osusza się bezwodnym MgSO_4 , przesącza do kolby okrągłodennej i odparowuje rozpuszczalnik na wyparce rotacyjnej. 1,2-O-izopropylideno-3-stigmasterylobursztynoilo-sn-glicerol oczyszcza się metodą chromatografii flash na kolumnie wypełnionej żelalem krzemionkowym (puriFlash® 30SIHP-F0040) z zastosowaniem elucji gradientowej, z udziałem eluentu o początkowym składzie heksan : octan etylu 100:0 i końcowym składzie heksan : octan etylu 5:1.

Otrzymuje się $1,4\text{ g}$ (68% wydajności teoretycznej) czystego 1,2-O-izopropylideno-3-stigmasterylobursztynoilo-sn-glicerolu o następujących stałych fizycznych i spektroskopowych:

Białe kryształy, temperatura topnienia $81\text{--}84^{\circ}\text{C}$, $R_f=0,25$ (heksan:octan etylu 5:1)

$^1\text{H NMR}$ δ : 0.69 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-18s}$), 0.79 (d, $J = 6.9\text{ Hz}$, 3H, $\text{CH}_3\text{-27s}$), 0.80 (t, $J = 7.5\text{ Hz}$, 3H, $\text{CH}_3\text{-29s}$), 0.84 (d, $J = 6.5\text{ Hz}$, 3H, $\text{CH}_3\text{-26s}$), 0.91-0.99 (m, 3H, H-9s, H-14s i H-15s(β)), 1.01 (s, 3H, $\text{CH}_3\text{-19s}$), 1.02 (d, $J = 4.8\text{ Hz}$, 3H, $\text{CH}_3\text{-21s}$), 1.08-1.29 (m, 5H, H-1s(α), H-12s(α), H-16s(β), H-17s i jeden z $\text{CH}_2\text{-28s}$), 1.36 i 1.42 (2 x s, 6H, $\text{CH}_3\text{-5}$ i $\text{CH}_3\text{-6}$), 1.36-1.62 (m, 9H, H-2s(β), H-7s(α), H-8s, $\text{CH}_2\text{-11s}$, H-15s(α), H-24s, H-25s i jeden z $\text{CH}_2\text{-28s}$), 1.69 (m, 1H, H-16s(α)), 1.80-1.89 (m, 2H, H-1s(β) i H-2s(α)), 1.92-2.08 (m, 3H, H-7s(β), H-12s(β) and H-20s), 2.28-2.33 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-4s}$), 2.57-2.63 i 2.64-2.68 (2 x m, 4H, $-\text{O}(\text{O})\text{C-CH}_2\text{-CH}_2\text{-C}(\text{O})\text{O}-$), 3.73 (dd, $J = 8.4$ i 6.2 Hz , 1H, jeden z $\text{CH}_2\text{-1}$), 4.07 (dd, $J = 8.4$ i 6.6 Hz , 1H, jeden z $\text{CH}_2\text{-1}$), 4.10 (dd, $J = 11.4$ i 6.0 Hz , 1H, jeden z $\text{CH}_2\text{-3}$), 4.18 (dd, $J = 11.4$ i 4.8 Hz , 1H, jeden z $\text{CH}_2\text{-3}$), 4.31 (m, 1H, H-2), 4.61 (m, 1H, H-3s), 5.00 (dd, $J = 15.2$ i 8.5 Hz , 1H, H-23s), 5.14 (dd, $J = 15.2$ i 8.6 Hz , 1H, H-22s), 5.36 (m, 1H, H-6s);

$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3) δ : 12.01 (C-18s), 12.23 (C-29s), 18.95 (C-27s), 19.28 (C-19s), 20.98 (C-11s), 21.07 (C-26s), 21.19 (C-21s), 24.32 (C-15s), 25.38 (C-28s), 25.36 i 26.67 (C-5 i C-6), 27.69 (C-2s), 28.89 i 29.01 ($-\text{O}(\text{O})\text{C-CH}_2\text{-CH}_2\text{-C}(\text{O})\text{O}-$), 29.35 (C-16s), 31.81 (C-8s), 31.85 (C-7s i C-25s), 36.55 (C-10s), 36.92 (C-1s), 38.01 (C-4s), 39.58 (C-12s), 40.48 (C-20s), 42.16 (C-13s), 49.98 (C-9s), 51.20 (C-24s), 55.88 (C-17s), 56.74 (C-14s), 64.93 (C-3), 66.30 (C-1), 73.50 (C-2), 74.38 (C-3s), 109.82 (C-4), 122.69 (C-6s), 129.23 (C-23s), 138.29 (C-22s), 139.50 (C-5s), 171.52 ($-\text{C}(\text{O})\text{O-Stig}$), 172.16 ($-\text{C}(\text{O})\text{O}-$);

IR (ATR, cm^{-1}): 971, 1052, 1174, 1231, 1446, 1727, 2891, 2949

HRMS dla $\text{C}_{39}\text{H}_{62}\text{O}_6[\text{M}+\text{Na}]^+$: 649,4444 (masa obliczona), 649,4445 (masa oznaczona)

Otrzymany 1,2-O-izopropylideno-3-stigmasterylobursztynoilo-sn-glicerol w ilości $1,3\text{ g}$ ($2,1\text{ mmol}$) umieszcza się w kolbie, rozpuszcza w 7 cm^3 dichlorometanu i 7 cm^3 trifluoroetanolu (TFE), schładza do temperatury -12°C stosując łaźnię lodową z NaCl, a następnie dodaje 45 mm^3 ($0,51\text{ mmol}$) kwasu trifluorometanosulfonowego. Mieszaninę reakcyjną miesza się na mieszadle magnetycznym przez $0,5$ godziny utrzymując temperaturę -12°C . W trakcie reakcji następuje hydroliza pierścienia acetalowego. Następnie dodaje się 72 mm^3 ($0,51\text{ mmol}$) trietyloaminy (TEA) w celu przerwania reakcji. Po odparowaniu rozpuszczalnika otrzymany produkt surowy oczyszcza się metodą chromatografii flash na kolumnie

wypełnionej żelom krzemionkowym (puriFlash® 50SIHP-F0040) z zastosowaniem elucji gradientowej, z udziałem eluentu o początkowym składzie heksan : octan etylu 100:0 i końcowym składzie heksan : octan etylu 1:1.

Otrzymuje się 0,54 g (45% wydajności teoretycznej) czystego 3-stigmasterylobursztynoilo-sn-glicerolu o następujących stałych fizycznych i spektroskopowych:

Białe kryształy, temperatura topnienia 147–149°C, $R_f=0,14$ (heksan:octan etylu 1:1)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 0.69 (s, 3H, CH₃-18s), 0.78 (d, J = 7.0 Hz, 3H, CH₃-27s), 0.79 (t, J = 7.5 Hz, 3H, CH₃-29s), 0.84 (d, J = 6.4 Hz, 3H, CH₃-26s), 0.90-1.03 (m, 3H, H-9s, H-14s i H-15s(β)), 1.01 (s, 3H, CH₃-19s), 1.01 (d, J = 6.4 Hz, 3H, CH₃-21s), 1.10-1.25 (m, 5H, H-1s(δ), H-12s(α), H-16s(β), H-17s i jeden z CH₂-28s), 1.38-1.58 (m, 9H, H-2s(β), H-7s(α), H-8s, CH₂-11s, H-15s(α), H-24s, H-25s i jeden z CH₂-28s), 1.69 (m, 1H, H-16s(α)), 1.82-1.89 (m, 2H, H-1s(β) i H-2s(α)), 1.92-2.07 (m, 3H, H-7s(β), H-12s(β) i H-20s), 2.28-2.33 (m, 2H, CH₂-4s), 2.42 (s, 2H, 2 x OH), 2.62-2.65 (2 x m, 4H, -O(O)C-CH₂-CH₂-C(O)O-), 3.60 (dd, J = 11.5 i 5.7 Hz, 1H, jeden z CH₂-1), 3.68 (dd, J = 11.5 i 4.0 Hz, 1H, jeden z CH₂-1), 3.94 (m, 1H, H-2), 4.10 (dd, J = 11.5 i 5.9 Hz, 1H, jeden z CH₂-3), 4.22 (dd, J = 11.5 i 4.8 Hz, 1H, jeden z CH₂-3), 4.61 (m, 1H, H-3s), 5.00 (dd, J = 15.2 i 8.6 Hz, 1H, H-23s), 5.14 (dd, J = 15.2 i 8.6 Hz, 1H, H-22s), 5.36 (m, 1H, H-6s);

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 12.01 (C-18s), 12.23 (C-29s), 18.95 (C-27s), 19.27 (C-19s), 20.97 (C-11s), 21.07 (C-26s), 21.19 (C-21s), 24.31 (C-15s), 25.38 (C-28s), 27.66 (C-2s), 28.88 (C-16s), 29.16 and 29.49 (-O(O)C-CH₂-CH₂-C(O)O-), 31.81 (C-8s), 31.85 (C-7s and C-25s), 36.54 (C-10s), 36.88 (C-1s), 37.98 (C-4s), 39.56 (C-12s), 40.48 (C-20s), 42.15 (C-13s), 49.96 (C-9s), 51.19 (C-24s), 55.87 (C-17s), 56.72 (C-14s), 63.16 (C-1), 65.53 (C-3), 69.99 (C-2), 74.66 (C-3s), 122.79 (C-6s), 129.23 (C-23s), 138.28 (C-22s), 139.39 (C-5s), 172.04 (-C(O)O-Stig), 172.20(-C(O)O-);

IR (ATR, cm⁻¹): 970, 1162, 1457, 1728, 2866, 2936, 3436

HRMS dla C₃₆H₅₈O₆[M+Na]⁺: 609,4131 (masa obliczona), 609,4132 (masa oznaczona).

Uzyskany 3-stigmasterylobursztynoilo-sn-glicerol (0,9 g, 1,53 mmol), DCC (0,66 g, 3,2 mmol) and DMAP (0,4 g, 3,2 mmol) umieszcza się w kolbie okrągłodennej i rozpuszcza w 30 cm³ bezwodnego chloroformu, po czym wkrapla kwas palmitynowy (0,82 g, 3,2 mmol) rozpuszczony w 20 cm³ chloroformu. Całość miesza się na mieszadle magnetycznym przez 24 godziny. Reakcja polega na estryfikacji dwóch grup hydroksylowych w 3-stigmasterylobursztynoilo-sn-glicerolu kwasem palmitynowym. Białe osad z mieszaniny poreakcyjnej odsącza się pod zmniejszonym ciśnieniem z użyciem lejka ze spiekami o porowatości G4. Uzyskany przesącz przemycia się kolejno 0,5 molowym roztworem kwasu solnego oraz nasyconym roztworem chlorku sodu do odczynu obojętnego. Warstwę organiczną osusza się bezwodnym MgSO₄, przesącza do kolby okrągłodennej i odparowuje rozpuszczalnik na wyparce rotacyjnej. Produkt oczyszcza się przy użyciu chromatografii flash z zastosowaniem elucji gradientowej, na kolumnie wypełnionej żelom krzemionkowym (puriFlash® 30SIHP-F0040) z udziałem eluentu o początkowym składzie heksan : octan etylu 100:0 i końcowym składzie heksan : octan etylu 10:1. Otrzymuje się 0,9 g (55% wydajności teoretycznej) 1,2-dipalmitoilo-3-stigmasterylobursztynoilo-sn-glicerolu o wzorze 1, gdzie R stanowi resztę kwasu palmitynowego.

Dane fizyczne i spektroskopowe otrzymanego 1,2-dipalmitoilo-3-stigmasterylobursztynoilo-sn-glicerolu (wzór 1 gdzie R₁ i R₂ stanowią resztę kwasu palmitynowego) są następujące:

Bezbarwne kryształy, temperatura topnienia 37–41°C, $R_f=0,31$ (heksan:octan etylu 10:1)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 0.69 (s, 3H, CH₃-18s), 0.79 (d, J = 6.8 Hz, 3H, CH₃-27s), 0.80 (t, J = 7.5 Hz, 3H, CH₃-29s), 0.84 (d, J = 6.4 Hz, 3H, CH₃-26s), 0.87 (t, J = 7.0 Hz, 6H, CH₃-16' i CH₃-16''), 0.92-0.99 (m, 3H, H-9s, H-14s i H-15s(β)), 1.01 (s, 3H, CH₃-19s), 1.02 (d, J = 6.7 Hz, 3H, CH₃-21s), 1.10-1.34 (m, 53H, H-1s(α), H-12s(α), H-16s(β), H-17s, jeden z CH₂-28s, CH₂-4'-CH₂-15' i CH₂-4''-CH₂-15''), 1.37-1.62 (m, 13H, H-2s(β), H-7s(α), H-8s, CH₂-11s, H-15s(α), H-24s, H-25s, jeden z CH₂-28s, CH₂-3' i CH₂-3''), 1.71 (m, 1H, H-16s(α)), 1.82-1.89 (m, 2H, H-1s(β) i H-2s(α)), 1.92-2.08 (m, 3H, H-7s(β), H-12s(β) i H-20s), 2.28-2.33 (m, 6H, CH₂-4s, CH₂-2' i CH₂-2''), 2.57-2.65 (2 x m, 4H, -O(O)C-CH₂-CH₂-C(O)O-), 4.12-4.20 (dwa dd, J = 12.2 i 5.9 Hz i J = 12.2 i 6.0 Hz, 2H, jeden z CH₂-1 i jeden z CH₂-3), 4.27-4.33 (dwa dd, J=11.9 i 4.4 Hz, 2H, jeden z CH₂-1 i jeden z CH₂-3), 4.60 (m, 1H, H-3s), 5.01 (dd, J = 15.1 i 8.7 Hz, 1H, H-23s), 5.15 (dd, J = 15.1 i 8.6 Hz, 1H, H-22s), 5.27 (m, 1H, H-2), 5.36 (m, 1H, H-6s);

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 12.00 (C-18s), 12.24 (C-29s), 14.12 (C-16' i C-16''), 18.95 (C-27s), 19.28 (C-19s), 20.97 (C-11s), 21.08 (C-26s), 21.19 (C-21s), 22.68 (C-15' i C-15''), 24.32 (C-15s), 24.83 i 24.86 (C-3' i C-3''), 25.39 (C-28s), 27.69 (C-2s), 28.81 (C-16s), 28.92, 29.08, 29.11, 29.27, 29.36, 29.48, 29.51, 29.66, 29.70 (O(O)C-CH₂-CH₂-C(O)O-, C-4' - C13' i C-4'' - C-13''), 31.80 (C-8s), 31.85

(C-25s), 31.91 (C-14', C-14" i C-7s), 34.02 i 34.16 (C-2' and C-2"), 36.55 (C-10s), 36.92 (C-1s), 38.00 (C-4s), 39.57 (C-12s), 40.51 (C-20s), 42.15 (C-13s), 49.97 (C-9s), 51.20 (C-24s), 55.86 (C-17s), 56.74 (C-14s), 61.98 (C-3), 62.52 (C-1), 68.69 (C-2), 74.40 (C-3s), 122.69 (C-6s), 129.22 (C-23s), 138.30 (C-22s), 139.48 (C-5s), 171.43 (-C(O)O-Stig), 171.89 (-C(O)O-), 172.90 i 173.27 (C-1' i C-1");

IR (ATR, cm⁻¹): 971, 1181, 1470, 1735, 2849, 2914

HRMS dla C₆₈H₁₁₈O₈[M+Na]⁺: 1085,8724 (masa obliczona), 1085, 8750 (masa oznaczona).

Przykład 2. Postępuje się jak w przykładzie 1 z tym, że w ostatnim etapie zamiast kwasu palmitynowego stosuje się kwas oleinowy (0,9 g, 3,2 mmol). Reakcja polega na estryfikacji dwóch grup hydroksylowych w 3-stigmasterylobursztynoiło-sn-glicerolu kwasem oleinowym. Po oczyszczeniu metodą chromatografii flash otrzymuje się 1,12 g (65% wydajności teoretycznej) 1,2-dioleoiło-3-stigmasterylobursztynoiło-sn-glicerolu o wzorze 1, gdzie R stanowi resztę kwasu oleinowego.

Dane fizyczne i spektroskopowe otrzymanego 1,2-dioleoiło-3-stigmasterylobursztynoiło-sn-glicerolu (o wzorze 1, gdzie R₁ i R₂ są identyczne i stanowią resztę kwasu oleinowego) są następujące:

Bezbarwna gęsta ciecz; R_f=0,28 (heksan:octan etylu 10:1)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ: 0.69 (s, 3H, CH₃-18s), 0.79 (d, J = 6.8 Hz, 3H, CH₃-27s), 0.80 (t, J = 7.5 Hz, 3H, CH₃-29s), 0.84 (d, J = 6.0 Hz, 3H, CH₃-26s), 0.87 (t, J = 7.0 Hz, 6H, CH₃-18' i CH₃-18"), 0.90-1.04 (m, 3H, H-9s, H-14s i H-15s(β)), 1.01 (s, 3H, CH₃-19s), 1.02 (d, J = 6.4 Hz, 3H, CH₃-21s), 1.05-1.37 (m, 45H, H-1s(α), H-12s(α), H-16s(β), H-17s, jeden z CH₂-28s, CH₂-4'-CH₂-7', CH₂-4"-CH₂-7", CH₂-12'-CH₂-17' i CH₂-12"-CH₂-17"), 1.38-1.65 (m, 13H, H-2s(β), H-7s(α), H-8s, CH₂-11s, H-15s(α), H-24s, H-25s, jeden z CH₂-28s, CH₂-3' i CH₂-3"), 1.70 (m, 1H, H-16s(α)), 1.81-1.89 (m, 2H, H-1 s(β) i H-2s(α)), 1.91-2.08 (m, 11H, H-7s(β), H-12s(β) i H-20s, CH₂-8', CH₂-8", CH₂-11' i CH₂-11"), 2.27-2.34 (m, 6H, CH₂-4s, CH₂-2' i CH₂-2"), 2.56-2.65 (2 x m, 4H, -O(O)C-CH₂-CH₂-C(O)O-), 4.12-4.19 (dwa dd, J=11.9 i 5.9 Hz oraz J=11.9 i 6.0 Hz, 2H, jeden z CH₂-1 i jeden z CH₂-3), 4.27-4.33 (dwa dd, J=11.8 i 4.4 Hz, jeden z CH₂-1 i jeden z CH₂-3), 4.61 (m, 1H, H-3s), 5.01 (dd, J = 15.1 i 8.6 Hz, 1H, H-23s), 5.15 (dd, J = 15.1 i 8.6 Hz, 1H, H-22s), 5.26 (m, 1H, H-2), 5.31-5.38 (m, 5H, H-6s, H-9', H-9", H-10' i H-10");

¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ: 12.01 (C-18s), 12.23 (C-29s), 14.10 (C-18' i C-18"), 18.95 (C-27s), 19.28 (C-19s), 20.99 (C-11s), 21.07 (C-26s), 21.19 (C-21s), 22.66 (C-17' i C-17"), 24.33 (C-15s), 24.81, 24.84 (C-3' i C-3"), 25.39 (C-28s), 27.20, 27.16 (C-8', C-8", C-11' i C-11"), 27.70 (C-2s), 28.89 (C-16s), 28.94, 28.94, 29.04, 29.08, 29.10, 29.12, 29.17, 29.18, 29.30, 29.51, 29.70, 29.75 (-O(O)C-CH₂-CH₂-C(O)O-, C-4' - C-7', C-12' - C-15', C-4" - C-7" i C-12"-C-15"), 31.82 (C-8s), 31.86 (C-25s), 31.89 (C-16', C-16" i C-7s), 33.99 i 34.14 (C-2' i C-2"), 36.56 (C-10s), 36.94 (C-1s), 38.02 (C-4s), 39.59 (C-12s), 40.48 (C-20s), 42.17 (C-13s), 50.00 (C-9s), 51.21 (C-24s), 55.90 (C-17s), 56.75 (C-14s), 61.99 (C-3), 62.52 (C-1), 68.74 (C-2), 74.41 (C-3s), 122.69 (C-6s), 129.25 (C-23s), 129.68 i 129.99 (C-9', C-9", C-10' i C-10"), 138.29 (C-22s), 139.50 (C-5s), 171.41 (-C(O)O-Stig), 171.87 (-C(O)O-), 172.85 and 173.21 (C-1' and C-1");

IR (ATR, cm⁻¹): 973, 1156, 1377, 1459, 1739, 2853, 2923

HRMS dla C₇₂H₁₂₂O₈[M+Na]⁺: 1137,9037 (masa obliczona), 1137, 9031 (masa oznaczona)

W celu potwierdzenia właściwości fizykochemicznych otrzymanych acylogliceroli opracowano formuły liposomowe z ich udziałem.

Liposomy, aby wydajnie i bezpiecznie dostarczać związki aktywne muszą charakteryzować się odpowiednim profilem stabilności. Dlatego stosowane są odpowiednie stabilizatory, np. cholesterol, który zmienia płynność błony, zwiększa jej sztywność i zmniejsza przepuszczalność. Odpowiednia zawartość sterolu zapewnia, np. powtarzalne uwalnianie leków. Obiecujące, ze względu na dodatkowe prozdrowotne działanie, jest wykorzystanie steroli roślinnych (Jovanovic A., Balanc B., Ota A., Grabnar P., Djordjevic V., Savikin K., Bugarski B., Nedović V i wsp. 2018. Comparative Effects of Cholesterol and β-Sitosterol on the Liposome Membrane Characteristics, Eur. J. Lipid Sci. Technol. 2018, 120, 1800039; Briuglia M., Rotella C., McFarlane A., Lamprou D. Influence of cholesterol on liposome stability and on in vitro drug release, Drug Deliv. and Transl. Res. 2015, 5, 231-242; Yu M., Song W., Tian F., Dai Z., Zhu Q., Ahmad E., Guo S., Zhu Ch., Zhong H., Yuan Y., Zhang T., Yi X., Shi X., Gan Y., Gao F. Temperature- and rigidity-mediated rapid transport of lipid nanovesicles in hydrogels. PNAS. 2019, 116, 5362-5369).

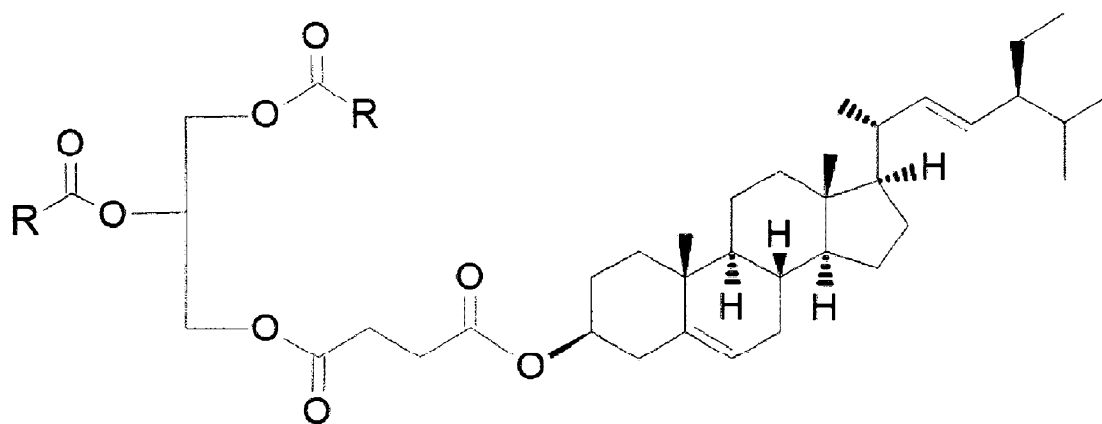
Liposomy wykorzystane do potwierdzenia właściwości przedmiotowych acylogliceroli, składały się z mieszaniny dipalmitoilofosfatydylocholiny (DPPC) i acyloglicerolu w trzech stosunkach molowych: 5:1; 10:1; 20:1, oznaczone na fig. 1 i 2 odpowiednio DPPC 2, DPPC 3 oraz DPPC 4. Przygotowane zostały liposomy zawierające 1,2-dipalmitoil-3-stigmasteryloksybursztynoiłoglicerol otrzymany zgodnie

z przykładem 1 (acyloglicerol 1) oraz liposomy zawierające 1,2-dioleilo-3-stigmasterylobursztynoiloglicerol otrzymany zgodnie z przykładem 2 (acyloglicerol 2). Próby badane porównywane były z próbą kontrolną stanowiącą tylko DPPC oznaczony na fig. 1 i 2 jako DPPC 1. Wyniki badań fluorymetrycznych wykazały, że acyloglicerole zawierające resztę stigmasterolu znacząco wpływają na płynność błon nowych liposomów oraz zmieniają parametry termotropowe dwuwarstwy lipidowej. Powyżej temperatury głównego przejścia fazowego DPPC obecność acyloglicerolu 1 i acyloglicerolu 2 powoduje zmniejszenie płynności błony czyli wzrost jej sztywności, co oznacza że struktura liposomu będzie bardziej stabilna w warunkach panujących w organizmie. Zwiększenie sztywności błony nowych liposomów wpłynie prawdopodobnie na zmniejszenie jej przepuszczalności, a stigmasterol wchodzący w jej skład stanowi dodatkowy czynnik prozdrowotny.

Zastrzeżenia patentowe

1. Acyloglicerol zawierający resztę stigmasterolu, **znamienny tym**, że identyczne reszty kwasów tłuszczowych znajdują się w pozycjach sn-1 i sn-2 oraz reszta stigmasterolu przyłączona jest poprzez linker bursztynowy w pozycji sn-3, przedstawiony na wzorze 1.
2. Sposób otrzymywania acyloglicerolu zawierającego resztę stigmasterolu **znamienny tym**, że substrat jakim jest (S)-solketal poddaje się reakcji estryfikacji hemibursztynianem stigmasterylu w bezwodnym rozpuszczalniku, w obecności czynnika sprzęgającego charakterystycznego dla reakcji estryfikacji oraz pirydyny albo pochodnej pirydyny, w wyniku czego otrzymuje się 1,2-O-izopropylideno-3-stigmasterylobursztynoilo-sn-glicerol, który następnie poddaje się reakcji hydrolizy w bezwodnym rozpuszczalniku w obecności katalizatora, otrzymując 3-stigmasterylobursztynoilo-sn-glicerol, który następnie poddaje się reakcji estryfikacji kwasem tłuszczowym w bezwodnym rozpuszczalniku, w obecności czynnika sprzęgającego charakterystycznego dla tego typu reakcji oraz pirydyny albo pochodnej pirydyny, a końcowy produkt o wzorze 1, oczyszcza się metodą chromatograficzną.
3. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że reakcje estryfikacji prowadzi się w bezwodnym chloroformie.
4. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że pochodną pirydyny jest dimetyloaminopirydyna.
5. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że w reakcjach estryfikacji jako czynnik sprzęgający stosuje się N,N'-dicykloheksylokarbodiimid.
6. Sposób według zastrz. 2, **znamiennym tym**, że jako katalizator w procesie hydrolizy stosuje się kwas trifluorometanosulfonowy a reakcję prowadzi się w temperaturze co najwyżej -8°C, od 15 do 120 minut, stosując jako rozpuszczalnik mieszaninę zawierającą trifluoroetanol TFE i bezwodny dichlorometan.
7. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że kwasem tłuszczowym jest kwas palmitynowy.
8. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że kwasem tłuszczowym jest kwas oleinowy.
9. Sposób według zastrz. 2, **znamienny tym**, że do oczyszczania produktów poszczególnych reakcji stosuje się zautomatyzowany system do chromatografii flash.

Rysunki



Wzór 1

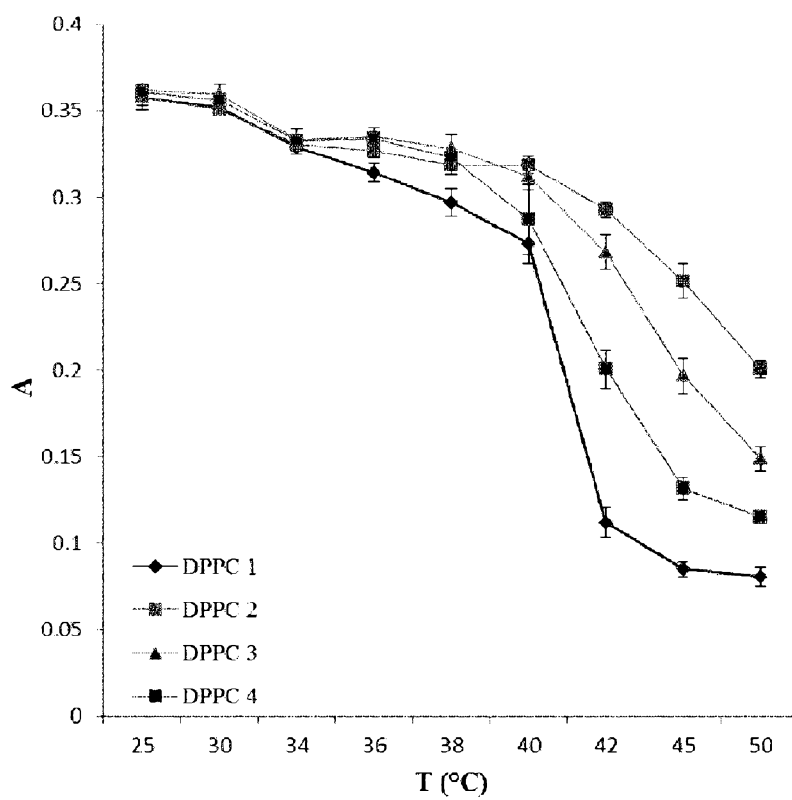


Fig. 1.

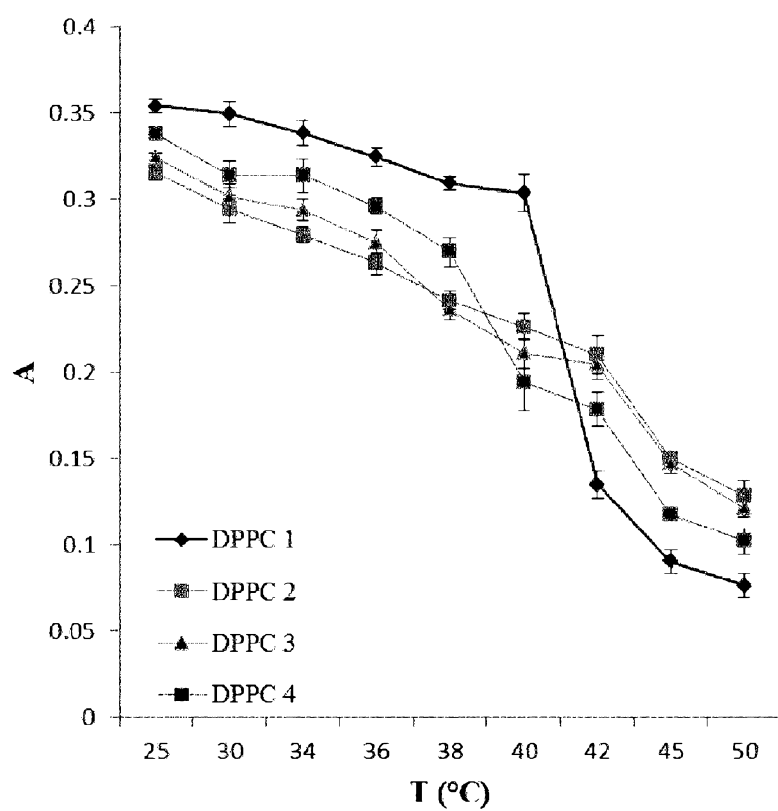


Fig. 2.